

Sterilisasi Ulang pada Perbanyakan *Somatic Embryogenesis* Kakao (*Theobroma cacao* L.) untuk Penyelamatan Embrio Terkontaminasi

Resterilization in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Somatic Embryogenesis Propagation to Save Contaminated Embryos

Sulistiyani Pancaningtyas*¹⁾ dan Cahya Ismayadi¹⁾

Ringkasan

Embriogenesis somatik merupakan suatu teknik untuk menghasilkan embrio primer melalui kegiatan kultur jaringan. Kontaminasi yang terjadi selama kegiatan kultur jaringan dapat disebabkan oleh kontaminasi internal dan eksternal. Sterilisasi ulang dapat digunakan untuk penyelamatan embrio yang terkontaminasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh metode sterilisasi ulang yang tepat pada bahan perbanyakan kakao asal kultur jaringan sesuai dengan prinsip sterilisasi sehingga diperoleh eksplan yang bebas bakteri dan embriogenik. Klon yang digunakan adalah ICCRI 03, ICCRI 04, Sulawesi 1, KW 514 dan ICCRI 05. Eksplan yang digunakan adalah rumpun (*cluster*) embriogenik dalam media multiplikasi dengan bahan sterilan sodium hipokhlorida. Penelitian menggunakan percobaan faktorial yang disusun dengan rancangan acak kelompok lengkap yang terdiri dari tiga faktor, yaitu faktor tingkat kontaminasi, faktor konsentrasi sterilan dan faktor waktu perendaman. Persentase keberhasilan metode sterilisasi ulang pada beberapa faktor tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Dari beberapa faktor, tingkat kontaminasi yang rendah, konsentrasi sterilan 10% dan perlakuan tanpa perendaman menunjukkan persentase hasil yang paling tinggi dalam penyelamatan embrio terkontaminasi. Terdapat perbedaan respons dari ke lima klon kakao dalam memproduksi eksplan embriogenik menggunakan kombinasi metode sterilisasi ulang.

Summary

Somatic embryogenesis is a technique to produce primary embryos using tissue culture. Contamination in tissue culture can be caused by internal and external contaminant. Resterilization can be performed to save contaminated embryos. The aim of this research is to obtain resterilization method in cocoa micropropagation by tissue culture so that free bacterial explants can be obtained and embryogenic. This experiments used five clones of cocoa, namely Sulawesi 1, KW 514, ICCRI 05, ICCRI 03 and ICCRI 04. Embryogenic clusters in multiplication medium were used as explant. Sodium hypochloride was used as sterilant. Several factors were evaluated using randomized block complete design, i.e. contaminant level, concentration of sterilant and period of sterilant application. Results of resterilization methods showed no significant effect among several factors tested. Among those factors, low contamination level, 10% concentra-

Naskah diterima (*received*) 18 Agustus 2010, disetujui (*accepted*) 22 Oktober 2010.

1) Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman No. 90, Jember, Indonesia.

*) Alamat penulis (*Corresponding Author*): pantja_iccri@yahoo.co.id

tion of sterilant and no soaking showed the highest percentage of saving of contaminated embryos. There was different response among five cocoa clones in producing embryogenic explants when using combination of resterilization methods.

Key words : *Theobroma cacao*, somatic embryogenesis, contamination, resterilization.

PENDAHULUAN

Embriogenesis somatik (*Somatic embryogenesis*, SE) kakao merupakan teknik untuk menghasilkan embrio primer dari jaringan tanaman, misalnya bunga (staminodia dan petala) dengan cara kultur jaringan. Menurut Li *et al.* (1998), sistem perbanyak SE menggunakan eksplan staminodia dan petala dapat dipergunakan secara luas pada berbagai genotipe kakao dengan tingkat efisiensi yang cukup tinggi. Perbanyak SE sudah banyak diaplikasikan untuk tanaman pangan, hortikultura dan industri termasuk tanaman perkebunan seperti kopi dan kakao (Maximova *et al.*, 2005; Samson *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2009).

Tanaman kakao yang berasal dari teknologi SE tidak hanya bersifat *true to type* saja, melainkan juga lebih unggul dibandingkan dengan tanaman yang diperoleh dengan teknik konvensional yang selama ini digunakan di seluruh dunia. Pengembangan lain melalui teknik SE adalah untuk mendapatkan tanaman bebas penyakit dan mengeliminasi virus, serta untuk konservasi plasma nutfah (Tan & Furtek, 2004).

Induksi kultur yang bebas dari kontaminan merupakan langkah yang sangat penting dalam kultur jaringan. Bahan tanam dari lapangan mengandung debu, kotoran dan berbagai kontaminan hidup pada permukaannya. Eksplan tanaman yang diambil dari lapangan dapat menjadi sumber kontaminan. Hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa melimpahnya

cendawan *Penicillium* spp. pada suatu kultur merupakan kurang efisiennya proses sterilisasi permukaan menggunakan 0,35% sodium hipokhlorida selama 3 menit. Penanganan bahan tanaman, peralatan kultur dan persiapan media dapat menjadi sumber berkembangnya kontaminan (Omamor *et al.*, 2007).

Kontaminan hidup dapat berupa cendawan, bakteri, serangga dan teluranya, tungau serta spora-spora. Bila kontaminan ini tidak dihilangkan, dengan media yang mengandung gula, vitamin dan mineral, maka kontaminan terutama cendawan dan bakteri akan tumbuh secara cepat. Dalam beberapa hari, kontaminan akan memenuhi seluruh botol kultur. Eksplan yang tertutupi kontaminan akhirnya mati.

Sterilisasi ulang dilakukan sebagai upaya penyelamatan embrio yang terkontaminasi bakteri. Pada beberapa jaringan kalus, ditemukan juga tingkat kontaminan yang berasal dari dalam jaringan tanaman, terutama bakteri. Bakteri ini sampai sekarang belum diidentifikasi. Kontaminan internal ini sangat sulit diatasi, karena sterilisasi permukaan tidak dapat membunuh kontaminan yang ada di dalam jaringan. Pada bahan tanam yang mengandung kontaminan internal, harus diberi perlakuan antibiotik atau fungisida yang sistemik. Keadaan ini menyulitkan penentuan prosedur sterilisasi standar yang berlaku untuk semua tanaman. Di samping itu sulit untuk menentukan prosedur standar yang dapat dipergunakan untuk suatu jenis tanaman yang berasal dari tempat yang

berbeda. Prosedur sterilisasi setiap bahan tanam harus ditentukan melalui percobaan pendahuluan (Gunawan, 1992).

Hal penting yang perlu disadari dalam sterilisasi bahan tanam adalah bahwa sel tanaman dan kontaminan merupakan benda hidup, sehingga kontaminan harus dihilangkan tanpa mematikan sel tanaman. Di negara-negara tropis, kontaminasi permukaan ini merupakan masalah serius, sehingga beberapa tahap sterilisasi harus dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji metode sterilisasi ulang yang tepat pada bahan perbanyakan kakao asal kultur jaringan sesuai dengan prinsip sterilisasi sehingga diperoleh eksplan yang bebas bakteri dan bersifat embriogenik.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Klon yang digunakan adalah ICCRI 03, ICCRI 04, Sulawesi 1, KW 514 dan ICCRI 05. Eksplan yang digunakan adalah rumpun embriogenik dalam media multiplikasi dengan umur kultur empat minggu, dan bahan sterilan sodium hipoklorida.

Penelitian ini menggunakan percobaan faktorial yang disusun dengan rancangan acak kelompok lengkap terdiri dari tiga faktor, yaitu faktor tingkat kontaminasi (ringan dan sedang), faktor konsentrasi sterilan 10% dan 5%, serta faktor waktu perendaman 5 menit dan tanpa perendaman.

Parameter yang diamati ini adalah persentase eksplan bebas bakteri dan persentase eksplan yang menghasilkan embriogenik. Pengamatan dilakukan pada bulan pertama dan bulan kedua setelah perlakuan. Untuk melihat pengaruh

perlakuan terhadap parameter yang diamati, dilakukan uji F dan bila uji tersebut nyata maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* pada taraf 5%.

Tingkat kontaminasi dibedakan dalam tiga kategori, yaitu tingkat kontaminasi ringan, sedang dan berat. Kategori kontaminasi ringan adalah bahwa koloni masih berbentuk lendir semi transparan, sedangkan kontaminasi sedang apabila koloni sudah berlendir putih tebal, dan koloni kontaminasi berat apabila koloni sudah menutupi seluruh permukaan eksplan bahkan menutupi permukaan media. Konsentrasi sterilan dan waktu aplikasi pemberian sterilan yang digunakan mengacu pada hasil penelitian yang telah dilakukan. Identifikasi jenis bakteri dilakukan untuk mengetahui pengaruh bakteri terhadap bahan tanam (kalus embriogenik) yang disterilisasi.

Pengujian beberapa isolat bakteri kontaminan melalui pengujian morfologi makroskopis dan mikroskopis melalui pewarnaan gram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Jember.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kecenderungan penurunan persentase eksplan yang bebas dari bakteri pada pengamatan bulan pertama dan kedua menunjukkan hasil yang berbeda, hal ini tergantung respons masing-masing klon. Satu perlakuan dapat efektif digunakan pada suatu klon, tetapi belum tentu dapat diaplikasikan pada klon lain. Persentase embriogenik menunjukkan nilai yang berbeda sesuai respons masing-masing klon.

Masing-masing klon menunjukkan respons yang berbeda terhadap kombinasi perlakuan sterilisasi (Tabel 1). Namun, hasil kombinasi perlakuan paling baik

diperoleh pada perlakuan tingkat kontaminasi ringan dengan konsentrasi sterilan 10% tanpa melalui proses perendaman (hanya pencelupan sesaat) untuk seluruh klon. Pada tingkat kontaminasi sedang, perlakuan terbaik diperoleh pada kombinasi perlakuan konsentrasi 5% tanpa melalui perendaman untuk klon Sulawesi 1 dan ICCRI 05, sedangkan untuk klon ICCRI 03 dan ICCRI 04 kombinasi perlakuan terbaik diperoleh pada perlakuan kontaminasi sedang dengan konsentrasi sterilan 10% melalui perendaman 5 menit, sedangkan untuk KW 514 semua kombinasi perlakuan menunjukkan bebas bakteri 100%.

Embriogenik yang terbentuk banyak diperoleh pada klon ICCRI 03. Dari pengamatan pada bulan kedua masih diperoleh eksplan yang terkena bakteri, meskipun tingkat serangannya ringan dan eksplan terbukti masih bersifat embriogenik. Umumnya bila kontaminasi ada di permukaan, respons kontaminasinya sangat cepat, yakni dalam waktu 2 x 24 jam sudah

bisa tampak, tetapi bila bersifat internal responnya muncul setelah beberapa hari bahkan kadang bisa sampai satu bulan saat umumnya sudah mulai terjadi induksi kalus (Santoso & Nursandi, 2003). Akhir-akhir ini, telah berkembang paradigma baru yang menarik dari kasus kontaminasi bakteri, yaitu bahwa kontaminasi tersebut tidak selalu merugikan pertumbuhan tanaman yang dikulturkan. Beberapa jenis bakteri endofitik dalam eksplan telah terbukti tidak merugikan pertumbuhan kultur, tetapi justru memacu pertumbuhan tanaman yang dikulturkan (Yusnita, 2003).

Pengaruh Tingkat Kontaminasi

Penelitian dilakukan terhadap beberapa tingkat kontaminasi, yaitu tingkat kontaminasi yang ringan dan tingkat kontaminasi sedang. Perlakuan pada tingkat kontaminasi yang berat tidak dilakukan karena umumnya akan mati.

Pada pengamatan bulan pertama pada klon KW 514 dan ICCRI 05 (Tabel 1)

Tabel 1. Pengaruh tingkat kontaminasi terhadap persentase keberhasilan sterilisasi ulang

Table 1. Effect of contamination level on reesterilization success percentage

Klon <i>Clone</i>	Tingkat kontaminasi <i>Contamination level</i>	Waktu pengamatan, bulan <i>Observation period, month</i>	
		1	2
Persentase keberhasilan (<i>Success percentage</i>)			
ICCRI 03	Ringan (<i>small</i>)	77.2 a	63.7 a
	Sedang (<i>moderate</i>)	42.8 b	19.9 a
ICCRI 04	Ringan (<i>small</i>)	87.5 a	66.3 a
	Sedang (<i>moderate</i>)	66.8 b	32.8 a
Sulawesi 1	Ringan (<i>small</i>)	98.3 a	96.7 a
	Sedang (<i>moderate</i>)	35.0 b	16.2 b
KW 514	Ringan (<i>small</i>)	100 a	100 a
	Sedang (<i>moderate</i>)	100 a	100 a
ICCRI 05	Ringan (<i>small</i>)	90.7 a	68.9 a
	Sedang (<i>moderate</i>)	80.7 a	46.7 a

Catatan (*Notes*): Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji Duncan pada taraf 5% (*Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different to Duncan at 5% level*).

menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata terhadap persentase eksplan yang bebas dari bakteri pada tingkat kontaminasi ringan dan sedang. Kedua klon tersebut menunjukkan persentase yang tinggi yaitu pada tingkat kontaminasi ringan dan sedang untuk KW 514 bernilai 100% dan untuk klon ICCRI 05 pada tingkat kontaminasi ringan bernilai 90,7% dan pada tingkat kontaminasi sedang menunjukkan nilai sebesar 80,7%. Pada klon ICCRI 03, ICCRI 04 dan Sulawesi 1, terdapat perbedaan sangat nyata antara tingkat kontaminasi ringan dan sedang.

Penurunan persentase eksplan yang bebas dari bakteri pada pengamatan bulan kedua, menunjukkan respons yang berbeda pada masing-masing klon kecuali KW 514 yang masih 100% bebas dari bakteri. Bakteri atau mikro-organisme endofitik (mikro-organisme yang hidup di dalam sel atau ruangan antarsel tanaman) sering merupakan biota dari tanaman sumber eksplan, yang sulit diatasi dengan sterilisasi permukaan. Keadaan ini menyebabkan koloni bakteri sering tidak muncul pada saat eksplan baru dikulturkan pertama kali. Bakteri tersebut tetap ada setelah disubkulturkan berkali-kali, karena hidupnya memang secara endofit di dalam jaringan tanaman (Yusnita, 2003).

Pengaruh Konsentrasi Sterilan

Sterilisasi permukaan pada tunas yang dorman menggunakan larutan merkuri khlorida dan sodium hipoklorida yang menunjukkan hasil bebas kontaminasi bakteri yang cukup tinggi, seperti yang telah digunakan pada sterilisasi kultur meristem dari tunas (Kunneman & Faaji-Groenan, 1998). Penambahan Burtan, Dettol dan NaOCl pada ethanol dapat mengurangi kemampuan bakteri untuk bertahan hidup hanya beberapa saat (Singha & Double, 1987).

Konsentrasi bahan sterilan pada konsentrasi 10% dan 5% tidak menunjukkan perbedaan nyata pada masing-masing klon dalam dua kali pengamatan (Tabel 2), kecuali pada klon Sulawesi 1. Hal ini menunjukkan bahwa kedua konsentrasi tersebut masih dimungkinkan untuk diaplikasikan. Namun, dari data di atas dapat diketahui bahwa konsentrasi 10% lebih baik untuk diaplikasikan dibandingkan dengan konsentrasi 5%.

Setiap perlakuan, dilakukan penurunan konsentrasi ($1/2$ konsentrasi awal) saat pembilasan eksplannya. Maksud dari penurunan konsentrasi pada tiap petri adalah agar tekanan selnya tidak rusak dengan menurunkan secara perlahan bahan sterilan (Gunawan, 2000). Hal yang penting dalam sterilisasi permukaan eksplan adalah mengkompromikan antara usaha untuk mendapatkan eksplan yang steril dan menjaga agar jaringan eksplan tidak rusak akibat tingginya konsentrasi disinfektan. Oleh sebab itu, perlu pembilasan ulang dengan konsentrasi larutan yang lebih rendah dengan waktu perendaman yang lebih singkat (Kunneman & Faaji-Groenan, 1998).

Pengaruh Lama Aplikasi Sterilan

Meskipun sebagian besar sumber kontaminan berasal dari dalam jaringan tanaman, terdapat pengaruh lain dalam penyebaran kontaminasi itu sendiri yang sulit untuk dideteksi yaitu dari pelaksana kultur jaringan dan peralatan kultur yang dipakai (Boxus & Terzi, 1987). Menurut Boxus & Terzi (1988), penyebaran kontaminasi bakteri dapat disebabkan oleh kurangnya pembakaran alat kultur (satu sampai tiga detik) dan adanya kemampuan bakteri bertahan hidup dalam etanol 96% (selama kurang lebih 40 menit). Pembakaran peralatan kultur selama

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi bahan sterilan terhadap persentase keberhasilan sterilisasi ulang

Table 2. Effect of sterilant concentration on the reesterilization success percentage

Klon <i>Clone</i>	Konsentrasi sterilan <i>Sterilant concentration</i>	Waktu pengamatan, bulan <i>Observation period, month</i>	
		1	2
Persentase keberhasilan (<i>Success percentage</i>)			
ICCRI 03	10%	67.2 a	43.3 a
	5%	62.8 a	40.1 a
ICCRI 04	10%	82.0 a	48.8 a
	5%	71.4 a	40.3 a
Sulawesi 1	10%	72.8 a	66.2 a
	5%	60.7 a	46.8 b
KW 514	10%	100 a	100 a
	5%	100 a	100 a
ICCRI 05	10%	89.5 a	66.9 a
	5%	81.7 a	48.7 a

Catatan (*Notes*) : Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji Duncan pada taraf 5% (*Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different to Duncan at 5% level*).

5 detik atau lebih (sampai peralatan kultur menjadi panas berwarna merah) dapat mengurangi penyebaran kontaminasi bakteri saat melakukan pemindahan eksplan (sub-kultur).

Pada pengamatan bulan pertama (Tabel 3) lamanya waktu aplikasi perendaman menunjukkan nilai yang berbeda nyata kecuali pada klon Sulawesi 1 yang berbeda nyata pada perlakuan tanpa perendaman sebesar 78,3% dan pada perendaman selama 5 menit sebesar 66,0%. Namun, pengamatan bulan kedua terjadi penurunan persentase bebas bakteri terkecuali pada klon KW 514 yang tetap 100% bebas bakteri. Pada pengamatan bulan kedua, faktor perlakuan lama perendaman menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada masing-masing klon, kecuali pada klon ICCRI 04 dan KW 514. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa perlakuan tanpa perendaman memberikan

respons yang lebih baik pada eksplan masing-masing klon dibandingkan dengan perlakuan lewat perendaman selama 5 menit.

Belum ada standar tersendiri mengenai lama aplikasi pemberian sterilan, karena hal ini tergantung dari masing-masing eksplan. Alternatifnya adalah dapat dipilih bentuk dan lama sterilisasi yang telah digunakan untuk bahan tanam lain yang kurang lebih mendekati sama sebagai referensi yang sudah ada. Umumnya, lama aplikasi sterilan yang diberikan pada eksplan diusahakan tidak terlalu lama dikarenakan bahan sterilan umumnya bersifat racun terhadap jaringan tanaman termasuk eksplan (Gunawan, 1992). Oleh karena itu dari hasil penelitian ini dimungkinkan eksplan yang direndam selama 5 menit dalam bahan sterilan dapat teracuni dan mati meskipun bebas dari bakteri.

Tabel 3. Pengaruh waktu perendaman terhadap persentase keberhasilan sterilisasi ulang

Table 3. Effect of immersion time on resterilization success percentage

Klon <i>Clone</i>	Perendaman <i>Soaking</i>	Waktu Pengamatan, bulan <i>Observation period, month</i>	
		1	2
Persentase keberhasilan (<i>Success percentage</i>)			
ICCRI 03	Tanpa (<i>without</i>)	67.2 a	42.3 a
	Dengan (<i>with</i>)	62.8 a	34.12 b
ICCRI 04	Tanpa (<i>without</i>)	79.7 a	60.0 a
	Dengan (<i>with</i>)	73.6 a	39.0 a
Sulawesi 1	Tanpa (<i>without</i>)	77.3 a	66.2 a
	Dengan (<i>with</i>)	66.0 b	46.7 a
KW 514	Tanpa (<i>without</i>)	100 a	100 a
	Dengan (<i>with</i>)	100 a	100 a
ICCRI 05	Tanpa (<i>without</i>)	86.7 a	80.0 a
	Dengan (<i>with</i>)	84.4 a	26.7 b

Catatan (*Notes*) : Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji Duncan pada taraf 5% (*Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different to Duncan at 5% level*).

Pembentukan Embrio

Dalam kultur jaringan, kultur yang bebas dari kontaminasi merupakan langkah yang sangat penting. Pada prinsipnya, sterilisasi adalah kegiatan untuk menghilangkan mikroorganisme sehingga didapatkan kondisi yang aseptis. Dengan demikian penting untuk diperhatikan bahwa dalam mendapatkan kondisi kultur yang steril jangan sampai merusak jaringan eksplan tanaman (Gunawan, 2000). Dalam hal ini, penerapan metode sterilisasi pada rumpun embrio yang terkontaminasi diharapkan tidak meracuni eksplan sehingga eksplan masih dapat menghasilkan embriogenik.

Dari data Tabel 4 dapat diketahui bahwa sterilisasi ulang pada eksplan yang sudah terkontaminasi, tidak mengurangi kemampuan eksplan tersebut untuk menghasilkan embriogenik. Hal ini berarti bahwa perlakuan sterilisasi ulang tidak mematikan jaringan tanaman. Namun, respons masing-masing perlakuan dalam menghasilkan embrio berbeda tergantung dari masing-masing klon. Hasil paling baik

dicapai oleh klon ICCRI 03 dalam menghasilkan embriogenik bahwa untuk masing-masing aplikasi perlakuan menunjukkan persentase yang berbeda.

Identifikasi Bakteri

Bakteri gram positif adalah bakteri yang akan berwarna ungu setelah pewarnaan gram, sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah. Bakteri gram positif dinding selnya tersusun oleh peptidoglikan dalam jumlah banyak, sedangkan bakteri gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan namun strukturnya lebih kompleks yang bagian terluarnya tersusun atas lipo-polisakarida (rantai karbohidrat dan lipid).

Pewarnaan gram adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi (Singleton & Sainsbury, 2006), karena merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi (Cooper & Hausman, 2007). Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan pepti-

Tabel 4. Pengaruh kombinasi beberapa perlakuan terhadap persentase embriogenik untuk masing-masing klon

Table 4. Effect of treatment combination on embriogenic percentage for each clone

Perlakuan <i>Treatment</i>	Persentase keberhasilan (<i>Success percentage</i>)				
	ICCRI 03	ICCRI 04	ICCRI 05	KW 514	Sulawesi 1
T1K1L1	23.3	0	10	0	13.3
T1K1L2	12	0	40	5	12
T1K2L1	30	0	30	20	18
T1K2L2	22.86	0	20	0	0
T2K1L1	26.67	17.5	20	6.7	0
T2K1L2	24.4	0	0	0	0
T2K2L1	22.5	20	0	16.7	13.3
T2K2L2	56.67	10	20	2.5	6.67

Catatan (*Notes*) :T₁ = tingkat kontaminasi ringan (*low contamination level*)T₂ = tingkat kontaminasi sedang (*medium contamination level*)K₁ = konsentrasi sterilan 10% (*concentration of sterilant*)K₂ = konsentrasi sterilan 5% (*concentration of sterilant*)L₁ = tanpa perendaman (*no soaking*)L₂ = waktu perendaman 5 menit (*5 minute soaking period*)

Tabel 5. Hasil identifikasi kontaminan

Table 5. Result of contaminant bacterial identification

No. Isolat <i>Isolate</i>	Sumber Isolat <i>Isolate source</i>	Morfologi pewarnaan gram <i>Gram stained morphology</i>		Jenis gram <i>Gram type</i>
		Makroskopis di media umur 3 hari <i>Microscopic on media after 3 days</i>	Mikroskopis <i>Microscopic</i>	
1	Botol (<i>bottle</i>) HL	Ø 0.3-0.6 cm, putih kekuningan, cembung <i>Yellowish white convex</i>	Batang pendek <i>Short rod</i>	Negatif <i>Negative</i>
2	Petri (<i>petridish</i>) 162/ST	Ø 0.3-0.5 cm, putih susu, cembung <i>Milky white convex</i>	Batang pendek <i>Short rod</i>	Positif <i>Positive</i>
3	Botol (<i>bottle</i>) MR	Ø 0.3 cm, putih susu, cembung <i>Milky white convex</i>	Batang pendek <i>Short rod</i>	Positif <i>Positive</i>
4	Petri (<i>petridish</i>) 162/INDT	Ø 0.4-0.5 cm, putih agak transparan, tengah cembung, di sekitar pipih agak berserabut <i>Rather transparant white Convex, around</i>	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>
5	Petri (<i>Petridish</i>) 162/ST 162/PT	Ø 0.1 cm, putih transparan, datar <i>Transparant white, flat</i>	Batang <i>Rod</i>	Negatif <i>Negative</i>

doglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan gram dibagi menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis, sedangkan bakteri gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada di antara dua lapis membran sel (Madigan *et al.*, 2006)

Tabel 5 menjelaskan hasil identifikasi isolat-isolat bakteri kontaminan dalam perbanyakan kakao secara SE. Bakteri gram negatif lebih berbahaya karena lipopolisakarida bersifat racun, dan membran terluar bakteri gram negatif memberikan perlindungan kepada bakteri gram negatif untuk bertahan pada sel inang. Bakteri gram negatif juga lebih kebal terhadap antibiotik dibandingkan bakteri gram positif karena dinding sel bakteri gram negatif mampu mencegah masuknya antibiotik yang membahayakannya. Banyak spesies bakteri gram negatif yang bersifat patogen, berbahaya bagi organisme inang (Prescott *et al.*, 2002). Sifat patogen ini umumnya berkaitan dengan komponen tertentu pada dinding sel gram negatif, terutama lapisan lipopolisakarida (sebagai endotoksin) (Prescott *et al.*, 2002).

KESIMPULAN

1. Kombinasi perlakuan tingkat kontaminasi ringan yang diaplikasikan dengan konsentrasi sterilan 10% tanpa melalui perendaman menunjukkan respons yang paling baik pada semua klon.
2. Eksplan yang terkontaminasi meskipun sudah disterilisasi diidentifikasi terinfeksi kontaminasi bakteri gram negatif yang toleran terhadap pengaruh antibiotik.
3. Terbentuknya embriogenik diperoleh pada eksplan yang bebas dari bakteri bahkan pada eksplan yang masih terkena bakteri (bakteri ringan).

DAFTAR PUSTAKA

- Boxus, P.H. & J.M. Terzi (1987). Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation schemes. *Acta Horticulture*, 212, 91–93.
- Boxus, P.H. & J.M. Terzi (1988). Control of accidental contamination during mass propagation. *ISHS Acta Horticulture*, 225, 190–198.
- Cooper, G.M. & R.E. Hausman (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Gunawan & L. Winata (1992). *Teknik Kultur Jaringan Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Gunawan & L. Winata (2000). *Teknik Kultur Jaringan Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kunneman, B.P.A.M. & G.P.M. Faaji-Groenan (1998). Elimination of bacterial contaminants: A matter of detection and transplanting Procedures. p. 183–188. *In: Bacterial and Bacteria-like Contaminant of Plant Tissue Culture*. *ISHS Acta Horticulture*.
- Li, Z.; A. Traore; S. Maximova & M.J. Gulitinan (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explant of cocoa (*Theobroma cacao* L.) using thidia-zuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 34, 293–299.
- Madigan M.T.; J.M. Martinko & T.D. Brock (2006). *Brock Biology of Micro-*

- organisms. New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Maximova, S.N.; A. Young; S. Pishak; C. Miller; A. Traore & M.J. Guiltinan (2005). Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L., *Springer Journal*, pp. 1–14. **In:** *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (Eds). S.M. Jain & P.K. Gupta. Springer, Dordrecht, Netherland.
- Omamor, I.B.; A.O. Asemota; C.R. Eke & E.I. Eziashi (2007). Fungal contaminant of the oil palm tissue culture in Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR). *African Journal of Agriculture Research*, 2, 534–537.
- Perera, P.I.P.; V.R.M. Vidhanaarachchi; T.R. Gunathilake; D.M.D. Yakan-dawala; V. Hoher; J.L. Verdeil & L.K. Weerakoo (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant cell Rep.*, 99, 99–81.
- Prescott, L.M.; J.P. Harley & D.A. Klein (2002). *Microbiology*. 5th Ed. Boston: McGraw-Hill.
- Samson, N.P.; C. Campa; L. Le Gal; M. Noirot; G. Thomas; T.S. Lokeswari & A. de Kochko (2006). Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 86, 37–45.
- Santoso; Untung & N. Fatimah (2003). *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM Press, Malang.
- Shan, L.; T. Guiying; X. Pingli; L. Zhanji & B. Yuping (2009). High efficiency in vitro plant regeneration from epicotyl explants of Chinese peanut cultivars, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 45, 525–531.
- Singha S.; G.K. Bissonette & M.L. Double (1987). Methods for sterilizing instrument contaminated with *Bacillus* sp. *Hort Science*, 22, 659.
- Singleton P. & D. Sainsbury (2006). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. New Jersey: Wiley Interscience.
- Tan C.L. & D.B. Furtek (2004). Recurrent embryogenesis and implication for gene transfer in *Theobroma cocoa* L. *Malaysian Cocoa Journal*, 1, 28–35.
- Yusnita (2003). *Kultur Jaringan Tanaman: Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka, Depok.
